

PCTORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina InternacionalSOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁷ : C07K 14/815, C12N 15/15		A1	(11) Número de publicación internacional: WO 00/31140 (43) Fecha de publicación internacional: 2 de Junio de 2000 (02.06.00)
(21) Solicitud internacional: PCT/ES99/00378 (22) Fecha de la presentación internacional: 24 de Noviembre de 1999 (24.11.99) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9802524 25 de Noviembre de 1998 ES (25.11.98) (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA [ES/ES]; E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT MÜNCHEN [DE/DE]; Nussbaumstrasse 20, D-80336 München (DE). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): REVERTER, David [ES/ES]; Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). VENDRELL, Josep [ES/ES]; Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). CANALS, Francesc [ES/ES]; Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona) (ES). HORSTMANN, Jeanny [DE/DE]; Surgical Clinic, Dept. Clinical Biochemistry, University of Munich, Nussbaum-			(74) Mandatarios: PONTI SALES, Adelaida etc.; Calle Consell de Cent, 322, E-08007 Barcelona (ES). (81) Estados designados: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
			Publicada Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben modificaciones.
(54) Title: INHIBITOR OF METALOCARBOXYPEPTIDASES AS FIBRINOLYTIC AGENT (54) Título: INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS COMO AGENTE FIBRINOLITICO (57) Abstract The invention relates to the gene of an inhibitor of metalocarboxypeptidases from the leech <i>Hirudo medicinalis</i> , its sequence and the protein coded thereby, the characterization of the same. The invention also relates to its pharmacological application as fibrinolytic agent. (57) Resumen La invención trata del gen de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas de la sanguijuela <i>Hirudo medicinalis</i> , secuencia del mismo y de la proteína por él codificada, de la caracterización de la misma. La invención también se refiere a su aplicación farmacológica como agente fibrinolítico.			

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Mali	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelandia	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS
COMO AGENTE FIBRINOLITICO

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a inhibidores de metalocarboxipeptidasas como agentes fibrinolíticos. En particular, la presente invención se refiere a la identificación, clonación y determinación de la secuencia
10 del gen y de la proteína por él codificada y a la aplicación de las propiedades fibrinolíticas de uno de ellos procedente de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

15 1.- ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las proteasas y sus inhibidores participan en numerosos procesos biológicos (Fritz, H., Schmidt, I., and Turk, V. (eds.) (1990) Special volume on Proteinase
20 Inhibitors and Biological Control Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 371; Avilés, F.X. (ed.) (1993) Innovations in Proteases and their Inhibitors, Walter de Gruyter, Berlin.), entre los cuales está el de la coagulación y la fibrinólisis, constituyendo la subfamilia de las
25 metalocarboxipeptidasas un importante grupo dentro de ellas (Hooper NM (ed.) (1996) Zinc Metalloproteases in Health and Disease, Taylor and Francis Ltd., London). Al contrario que en el caso de los inhibidores de endopeptidasas, tan sólo se han identificado unos pocos
30 inhibidores de metalocarboxipeptidasas (Avilés et al. (1993) Eur. J. Biochem. 211, 381-389; Hass & Ryan (1981) Methods Enzymol. 80, 778-791; Homandberg et al. (1989) Arch. Biochem. Biophys. 270, 153-161; Normant et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 12225-12229). Los
35 inhibidores de Solanacea y de Ascaris inhiben las

carboxipeptidasas a través de su región C-terminal que interacciona con el enzima como un sustrato. Por el contrario, el inhibidor procedente del cerebro de rata inhibiría a través de una región que presenta similitud de
5 secuencia con el bucle inhibidor de las regiones "pro" de estos enzimas, o sea posicionando el bucle inhibidor sobre el centro activo del enzima (Coll et al. (1991) EMBO J., 10, 1-9; Guasch et al. (1992) J. Mol. Biol., 224, 141-57; García-Saez et al. (1997) EMBO J. 16, 6906-6913).

10 Se han aislado diversos inhibidores proteicos de proteasas a partir de sanguijuelas (Ascenzi et al. (1995) Molec. Aspects Med. 16, 215-313). Entre los mismos los hay que actúan como anticoagulantes, por ejemplo las hirudinas específicas de trombina y la antistatina específica del
15 factor Xa (Tuszynsky et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 9718-9723). Es un hecho destacable que la sanguijuela parece contener inhibidores contra todas las proteasas de los mastocitos humanos (triptasa, quimasa, catepsina G y metalocarboxipeptidasa A). Los mastocitos al ser activados
20 en los procesos infectivos liberan enzimas que contribuyen a iniciar el sistema de defensa del huésped. Los inhibidores que produce la sanguijuela podrían tener como función el bloqueo del mencionado sistema de defensa del huésped [Huntley et al. (1990) Parasite Immunol. 12, 85-
25 95; Douch et al. (1996) Int. J. Parasitol. 26, 91-95; Miller, H.R. (1996) Vet. Immunol. Immunopathol. 54, 331-336; Arizono et al. (1996) Clin. Exp. Immunol. 106, 55-61].

Se describe a continuación la secuencia del gen, de
30 la proteína en él codificada y algunas características de un nuevo inhibidor de metalocarboxipeptidasas obtenido de sanguijuela, el primero descrito para este organismo, que se ha denominado LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor). También se describe su producción recombinante
35 y ensayos de actividad biológica. El LCI presenta muy poca

similitud de secuencia con otros inhibidores de carboxipeptidasas descritos previamente. El LCI participaría en la eliminación de coágulos sanguíneos a través de la inhibición de la carboxipeptidasa B (o 5 metalocarboxipeptidasa B) de plasma sanguíneo, también denominada TAFI, enzima que ha sido recientemente involucrado en el retardo de la fibrinólisis (Bajzar et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14477-14484; Sakharov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 14477-14482).

10

2.- COMPENDIO DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención la identificación de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas, 15 el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor), de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*.

Es otro objetivo de la presente invención la determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y la caracterización de la misma como una 20 molécula con alta actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

Es todavía otro objetivo de la invención la utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con secuencia ID N° 2, aislada o en combinación 25 con otros agentes fibrinolíticos a los que complementa o potencia, para la preparación de un medicamento útil como agente fibrinolítico.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como agente 30 activo, una cantidad efectiva de dicho inhibidor de metalocarboxipeptidasas, o de derivados, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Finalmente, es objetivo de la presente invención la caracterización de la actividad fibrinolítica del 35 inhibidor de metalocarboxipeptidasas, el LCI, como

principal objetivo terapéutico y aplicado del mismo.

3. DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5 Los objetivos de la presente invención están relacionados con la identificación, la clonación y determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y con sus propiedades fibrinolíticas, de un inhibidor de metalocarboxipeptidasa procedente de la
10 sanguijuela *Hirudo medicinalis*, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

En la forma de realización preferida de la presente invención los objetivos propuestos se han alcanzado mediante un proceso que incluye los objetivos parciales
15 que se describen a continuación.

En primer lugar se ha aislado e identificado una actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas en extractos de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* (LCI de Leech Carboxypeptidase Inhibitor). Asimismo se ha
20 establecido un procedimiento de purificación del LCI, nativo y recombinante, y unos procedimientos de caracterización del mismo.

En una forma de realización adicional de la presente invención se ha obtenido una secuencia peptídica del
25 fragmento N-terminal del inhibidor LCI nativo obtenido y purificado a partir del extracto de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. La información obtenida a partir de esta secuencia ha sido clave para el diseño de diversos oligonucleótidos que han permitido la posterior clonación
30 del gen del LCI.

En otra forma de realización de la presente invención se ha preparado una genoteca de expresión de cDNA que, juntamente con los oligonucleótidos anteriormente mencionados, han permitido diseñar una estrategia de PCR-
35 RACE mediante la que se ha logrado la clonación del gen

del LCI. Consecuencia directa de esta forma de realización ha sido la determinación de la secuencia nucleotídica del mencionado gen y de la proteína por él codificada.

En otra forma adicional de realización de la presente invención se han diseñado sistemas de expresión heteróloga de LCI recombinante (rLCI), sólo o en forma de proteína de fusión. Asimismo se han diseñado los correspondientes protocolos de separación proteolítica del rLCI de la proteína de fusión y los procedimientos de purificación y
10 caracterización del rLCI.

En otra forma de realización de la presente invención se ha determinado la actividad fibrinolítica del LCI, actividad relacionada con su acción inhibidora de metalocarboxipeptidasas. La utilidad terapéutica del LCI
15 se basa en la mencionada actividad fibrinolítica del mismo.

A continuación se describe un ejemplo que ilustra el modo preferente de desarrollo de la presente invención, el cual no pretende abarcar todas las posibilidades de diseño
20 y aplicación de la presente invención.

4.- EJEMPLO DEL MODO PREFERIDO DE REALIZACION DE LA INVENCION

25 Los objetivos de la presente invención se han alcanzado con la identificación, la determinación de la secuencia del gen y de la proteína por él codificada, y de sus propiedades fibrinolíticas, de un inhibidor de metalocarboxipeptidasas procedente de la sanguijuela
30 Hirudo medicinalis, el LCI (de Leech Carboxypeptidase Inhibitor).

35 4.A. Aislamiento, purificación, determinación de la masa y

secuenciación del LCI.

Se purificó LCI a partir de extracto de sanguijuela *Hirudo medicinalis* (GEN Therapeutica, Bad Zwischenahn). Se disolvieron 0,5 g de extracto en tampón Tris/acetato 20 mM (pH 8,0). Se centrifugó a 13.000 x g durante 10 min y tras equilibrar el pH se cargó el sobrenadante en una columna de intercambio aniónico preparativa (TSK-DEAE 5PW, 2,5 x 15 cm; Toyo-Soda) conectada a un sistema de FPLC (Pharmacia). Se eluyó mediante un gradiente lineal (0% a 100%) de acetato amónico 0,8 M, tamponado con Tris/acetato 20 mM (pH 8,0). El flujo fue de 4 ml/min durante 80 min. Las fracciones se recogieron y se determinaron las actividades inhibitoras de las metalocarboxipeptidasas CPA1, CPA2 y CPB pancreáticas. La actividad inhibitora del LCI sobre dichas metalocarboxipeptidasas, así como sobre la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática, la más relevante para esta invención, así como y las correspondientes K_i fueron determinadas de acuerdo con ensayos previamente descritos (Burgos et al. (1989) J. Chromatog., 481, 233-243; Molina et al. (1992) Gene 116,129-138 y (1994) J. Biol. Chem. 269, 21467-21472). Las K_i resultantes fueron de ~0,4 nM, a pH 7,5. Las fracciones que presentaban actividad inhibitora (fracciones 64min y 69 min) fueron liofilizadas y cromatografiadas por HPLC de fase reversa (columna Vydac C4) con un gradiente lineal (20% a 42%) de acetonitrilo en ácido trifluoroacético 0,1%, a un flujo de 1 ml/min durante 60 min. La actividad inhibitora de metalocarboxipeptidasas eluyó a los tiempos de retención de 38 y 34 min. La pureza del inhibidor se determinó mediante electroforesis de SDS-tricina (Schägger & Von Jagow (1986) Anal. Biochem. 166, 369-376). La masa molecular se determinó mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF (BRUKER). Se realizó también la secuenciación de residuos N-terminales e internos mediante degradación

automática de Edman. La secuencia de los mencionados 28 residuos corresponde con la del apartado "Listado de secuencias".

5 4.B. Clonación y secuenciación del cDNA del LCI.

A partir de la secuencia peptídica N-terminal y de un fragmento interno del LCI se diseñaron oligonucleótidos degenerados que permitieron una amplificación de cDNA por
10 RACE-PCR (Fritz et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 3747-3753; Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002; Chenchik et al. (1996) BioTechniques 21, 526-534). Los oligonucleótidos, sintetizados por MWG-Biotech (Ebersberg, Germany), fueron los siguientes:

15 N1: 5'-GACGAATCNTTYTNTGYTAYCA-3' con N=A,C,G,T e Y=C,T (secuencia deducida a partir de los aminoácidos 5-12 del LCI)

N2: 5'-TGTGCTAYCARCCNGAYCARGT-3' con R=A,G (a partir de los aminoácidos 9-16)

20 N3: 5'-CCAGACCARGTNTGYTGYTTYAT-3' (a partir de los aminoácidos 13-20)

C1: 5'-CCTGTGSWRTANGGNACCCA-3' con S=G,C y W=A,T; (a partir de los aminoácidos 55-49)

YXT: 5'-CGAGGGGGATGGTCGACGGAAGCGACCT18-3', (modificado
25 según Fritz et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 3747-3753)

Y: 5'-CGAGGGGGATGGTCGACGG-3', (representa parte de YXT)

X: 5'-GATGGTCGACGGAAGCGACC-3', (representa parte de YXT)

El RNA total se aisló mediante el método del
30 tiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159) a partir de sanguijuelas congeladas, y el mRNA poly(A)+ se purificó mediante afinidad por oligo (dT) (Pharmacia). La primera hebra del cDNA se realizó utilizando como cebador el oligonucleótido
35 XYZ. En primer lugar se amplificó un fragmento interno del

cDNA así como el 3' (3'-RACE). Para la primera fase del PCR se utilizaron los cebadores N1, N2 y N3 en todas las combinaciones con el cebador C1 o los cebadores X y Y. Se utilizó la polimerasa Goldstar polymerase (Eurogentec, Bélgica) mediante 30 ciclos de: a 94°C durante 20 sec, seguido de 1 min a 53°C y finalmente la extensión final a 72°C durante 2 min. Los productos del PCR se separaron por geles de electroforesis en agarosa 1,8%/Tris acetato. Los productos de la amplificación se eluyeron del gel y subclonados en el sistema pGEM-T AT-de (Promega) utilizados posteriormente para transformar la cepa JM109 de E.coli. El extremo 5' del cDNA se obtuvo mediante el Marathon cDNA amplification kit de Clontech, USA. Para ello se utilizó el cebador adaptador AP1 de Marathon y los cebadores específicos del gen 5'-TAGTCAAGAAGAGAAATGCCCT-3' y 5'-TTAGCCTCGCATCAGTGACACACG-3' (complementarios a los nucleótidos 361-340 y 300-277 del cDNA (ver el apartado Listado de secuencias). La secuenciación de las diferentes secuencias parciales amplificadas permitió diseñar nuevos cebadores para 5'-RACE. Finalmente se obtuvo la secuencia del cDNA del LCI, consistiendo en un ORF de 243 pb, además de dos regiones no traducidas, una de 21 pb situada en posición 5' respecto al ORF y otra de 182 pb situada en 3' del mismo (ver el apartado Listado de secuencias). La traducción del ORF genera una secuencia de 81 aminoácidos, conteniendo un péptido señal de 15 residuos, lo que implica una secuencia del LCI maduro de 66 aminoácidos (ver el apartado Listado de secuencias). Una búsqueda en los bancos de datos de secuencias mostró que ninguna secuencia similar al LCI había sido descrita previamente.

4.C. Expresión heteróloga del LCI.

La expresión heteróloga del LCI se realizó mediante los vectores pIN-III-OmpA3 (Ghrayeb et al. (1984) EMBO J.

3, 2437-2442; Molina et al. (1992) Gene 116,129-138; Molina et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 21467-21472) y pET-32b (Promega). El vector pIN-III-OmpA3 fue digerido con EcoRI, los extremos digeridos con nucleasa Mung bean y digeridos con BamHI. Al vector linearizado resultante se le ligó el producto de lo obtenido (descrito en el apartado anterior) generándose el plásmido pIN-III-OmpA3-LCI y se transformó en la cepa MC1061 de E. coli. De forma similar, el vector pET-32b se digirió con EcoRV y BamHI y se le ligó el producto de lo obtenido (descrito en el apartado anterior) generándose el plásmido pET-32b-LCI y se transformó en la cepa ADA494 de E. coli.

Para la obtención del LCI recombinante (a partir de ahora rLCI) como inóculo se utilizaron 5 ml de MC1061/pIN-III-OmpA3-LCI que se incubaron durante la noche a 37°C en M9CAS (conteniendo 0,3% de glicerol) y se utilizaron para inocular 5 l del mismo medio. Después de 2 h se añadió IPTG, a una concentración final de 0,5 mM. 24 h tras la inducción se centrifugó el cultivo a 10.000 x g durante 20 min y el sobrenadante se pasó a través de un cartucho Sep-Pak Plus C18 (Waters, Millipore). El material retenido en la columna se eluyó con 40 ml de 2-propanol al 30% y se concentró con un roto-vapor para eliminar el disolvente orgánico. A continuación se purificó el rLCI tal y como se ha descrito en el apartado 4.A. El rLCI se encontraba en el medio de cultivo. La cuantificación se realizó determinando la actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

En el caso del plásmido ADA494/pET-32b-LCI, el procedimiento fue el siguiente. Como inóculo se utilizaron 5 ml de ADA494/pET-32b-LCI, que se incubaron durante la noche a 37°C en medio LB y que se utilizaron para inocular 1 l del mismo medio. Cuando la densidad óptica del cultivo alcanzó valores de 0,4-0,6, se añadió IPTG, a una concentración final de 0,4 mM. Tres horas después se

purificó el rLCI (intracelular y como proteína de fusión a tioredoxina) utilizando una columna de Ni^{2+} (Pharmacia). La proteína de fusión se eluyó mediante imidazol 1 M, NaCl 0,5 M, Tris/HCl 20 mM, pH 7,9. Posteriormente se separó el rLCI de la proteína de fusión mediante digestión por enteroquinasa (Sigma) y purificó tal y como se ha descrito en el apartado 4.A. La cuantificación se realizó determinando la actividad inhibidora de metalocarboxipeptidasas.

En ambos casos se optimizó la expresión. En el caso del sistema pIN-III-OmpA3 el rendimiento más elevado se encontró utilizando glicerol 0,3% y IPTG 0,5 mM, de acuerdo con resultados previos en sistemas semejantes (Molina et al. (1992) Gene 116,129-138). El rendimiento, cultivado en frasco, fue de 3,4 mg/l de sobrenadante, con una recuperación del 60%. El rLCI se purificó según lo descrito en el apartado 4.A., y como control del procesamiento correcto por parte de la célula huésped se realizó una secuenciación del extremo N-terminal y una determinación de la masa molecular mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF. En el caso del sistema pET-32b se obtuvieron 20-40 mg/l de la fusión tioredoxina-rLCI. Tras la digestión mediante enteroquinasa se obtenían 7 mg/l con una recuperación del 50%.

4.D. Ensayo de actividad fibrinolítica del LCI.

El LCI promueve la degradación de los coágulos de fibrina por inhibición de la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática o TAFI (la constante de inhibición es $\sim 0,4\text{nM}$). Ello es congruente con el hecho demostrado de que este último enzima inhibe la fibrinólisis al destruir los sitios de fijación del plasminógeno a la fibrina (Sakharov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 14477-14482). El ensayo se realizó con los

componentes purificados de la fibrinólisis. La coagulación inicial (promovida por trombina) y la subsiguiente fibrinólisis (inducida por el activador del plasminógeno) se monitorizó a lo largo del tiempo por el aumento o
5 disminución de la turbidez en un ensayo espectrofotométrico a 405 nm (Bajzar et al. (1996) J. Biol. Chem. 271,16603-16608). Diferentes concentraciones de carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática, previamente activada a partir de su zimógeno
10 por un mezcla de trombina (20 nM)-trombomodulina (50 nM), se ensayaron frente a concentraciones crecientes de LCI en un tampón HEPES 0,02 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, Tween80 0,01%, pH 7,4. El medio de fibrinólisis consistía en fibrinógeno (3,36 mM), Glu plasminógeno (0,89 mM), α 2-
15 antiplasmina (0,56 mM) y antitrombina III (1,11 nM). Esta mezcla se mezcló con las diferentes concentraciones preparadas previamente de mezclas de carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática-LCI y se ensayó en pocillos de una microplaca que contenía trombina (6,0 nM)
20 y activador de plasminógeno (441pM). Se siguió la turbidez, a 405 nm, de las muestras de cada pocillo de la placa con medidas cada 2,5 min, a 37°C, y se midió el tiempo medio de lisis del coágulo. En las muestras que no contenían LCI el tiempo necesario para la lisis del
25 coágulo era mucho mayor (no llegando nunca a más de un 5% de lisis en 30 horas). En cambio, en presencia de LCI, la carboxipeptidasa B (o metalocarboxipeptidasa B) plasmática resultó inhibida y por lo tanto la turbidez del medio desaparece más rápidamente. La destrucción del coágulo
30 resultó mucho más rápida (la lisis ya era del 75% en 1,5 horas, alcanzándose el 100% en menos de 3 horas).

R E I V I N D I C A C I O N E S

1. Secuencia nucleotídica recombinante que codifica
5 para una secuencia de proteína que corresponde a un
inhibidor de metalocarboxipeptidasas de *Hirudo
medicinalis*.
2. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1,
caracterizado por el hecho de que comprende la secuencia
10 identificada como SEQ ID N° 1 del listado de secuencias.
3. Secuencia polipeptídica codificada en la secuencia
nucleotídica según las reivindicaciones 1 y 2,
caracterizada por el hecho de que comprende la secuencia
identificada como SEQ ID N° 2 del listado de secuencias.
- 15 4. Secuencia polipeptídica de acuerdo con la
reivindicación 3, donde dicha secuencia es sustancialmente
homóloga a la secuencia identificada como SEQ N°2.
5. Secuencia nucleotídica que comprende una secuencia
codificante de un polipéptido sustancialmente homólogo a
20 la secuencia ID N° 2, según la reivindicación 3.
6. Vector de expresión procariota o eucariota
caracterizado por el hecho de que incluye la secuencia
nucleotídica recombinante según cualquiera de las
reivindicaciones 1, 2 ó 5, y por el hecho de que es capaz
25 de expresar el inhibidor de metalocarboxipeptidasas
biológicamente activo.
7. Célula de *Escherichia coli* transformada
caracterizada por el hecho de que comprende un vector de
expresión según la reivindicación 6 y por el hecho de que
30 es capaz de producir el inhibidor de
metalocarboxipeptidasas biológicamente activo.
8. Procedimiento para preparar el inhibidor de
metalocarboxipeptidasas recombinante según cualquiera de
las reivindicaciones 3 a 4, caracterizado por el hecho de
35 que comprende

(i) el cultivo del transformante que contiene un vector de expresión capaz de expresar un inhibidor de metalocarboxipeptidasas biológicamente activo; y

(ii) la obtención y purificación del mismo.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 caracterizado por el hecho de que el proceso recombinante se lleva a cabo en un huésped procariota o eucariota.

10. Inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4, como agente fibrinolítico.

11. Utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas de acuerdo con las reivindicaciones 3 ó 4, para la preparación de un medicamento útil como agente fibrinolítico.

12. Utilización del inhibidor de metalocarboxipeptidasas según la reivindicación 11, en combinación con otros agentes fibrinolíticos a los que complementa o potencia para la preparación de un medicamento útil como agente fibrinolítico.

13. Composición farmacéutica que comprende, como agente activo, una cantidad efectiva del inhibidor de metalocarboxipeptidasas, o de derivados, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Lista de secuencias.

INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE

- 5 (A) NOMBRE: UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
(B) CALLE: Campus UNIVERSITARI
(C) CIUDAD: BELLATERRA
(D) PROVINCIA: BARCELONA
(E) PAÍS: ESPAÑA
- 10 (F) CÓDIGO POSTAL (CD):08193
(G) TELEFONO: 93-581-16 36
- (A) NOMBRE: LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(B) CALLE: 20 NUSSBAUMSTRASSE
- 15 (C) CIUDAD: MÜNCHEN
(D) PAÍS: ALEMANIA
(E) CÓDIGO POSTAL (CD):D-80336
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: INHIBIDOR DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS COMO AGENTE FIBRINOLÍTICO
- 20 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) FORMATO PARA LECTURA POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE SOPORTE: Disco flexible
(B) ORDENADOR: IBM PC Compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 25 (D) PROGRAMA: Patentin Release #1.0. Version #1.30 (EPO)

SEQ ID NO:1

LOCUS: cDNA lineal de doble hélice

DEFINICION: gen del inhibidor de metalocarboxipeptidasas

30 de Hirudo medicinalis

CARACTERISTICAS: Localización/Calificadores
/producto ="LCI"
/codon de inicio=22
/codón de parada= 265

35 ORIGEN DE LA MOLECULA: (a) Organismo:Hirudo medicinalis

THIS PAGE BLANK (USPTO)

COMPOSICION DE BASES 129 A 99 C 96 G 141 T

GACTTGGTAA CTCATTCGAT CATGTTTCTG CTCGTTTTCC TGTGCTGCCT 50

CCACCTGGTG ATTTTCGTCGC ATACACCAGA TGAGAGTTTC TTGTGCTACC 100

AACCAGACCA GGTGTGCTGT TTCATTTGCA GAGGAGCGGC ACCTTTGCCT 150

5 TCAGAAGGGG AATGCAATCC ACATCCTACA GCACCCTGGT GCCGGGAAGG 200

GGCTGTAGAG TGGGTTCCCT ACTCTACTGG TCAATGTCGC ACAACCTGCA 250

TCCCATATGT CGAGTAGATG ACCCATCGTG TGTCCTGAT GCGAGGCTAA 300

CTCTCATTAT TTTCTGAAC GCATCCTTGT TGAAATTTAA GGGCATTCT 350

CTTCTTGACT AATTATTTTG CTGAGTTAAA ATAATAAAAT AATATTGAAG 400

10 CATTATTTAA TAATGTTCTC GTTGAATAA AATATGATCG AAAGATAAAA 450

AAAAAAGAAA AAAAA 465

SEQ ID NO:2

1 gacttggttaactcattcgatc 21

15 22 ATG TTT CTG CTC GTT TTC CTG TGC TGC CTC CAC CTG GTG 60

-15 M F L L V F L C C L H L V -3

61 ATT TCG TCG CAT ACA CCA GAT GAG AGT TTC TTG TGC TAC 99

-2 I S S H T P D E S F L C Y 11

20 100 CAA CCA GAC CAG GTG TGC TGT TTC ATT TGC AGA GGA GCG 138

12 Q P D Q V C C F I C R G A 24

139 GCA CCT TTG CCT TCA GAA GGG GAA TGC AAT CCA CAT CCT 177

25 25 A P L P S E G E C N P H P 37

178 ACA GCA CCC TGG TGC CGG GAA GGG GCT GTA GAG TGG GTT 216

38 T A P W C R E G A V E W V 50

30 217 CCC TAC TCT ACT GGT CAA TGT CGC ACA ACC TGC ATC CCA 255

51 P Y S T G Q C R T T C I P 63

256 TAT GTC GAG tagatgacccatcgtgtgtcactgatgagaggctaactc 303

64 Y V E * 66

35 304 tcattattttctgaacgcataccttgttgaaatttaagggcatttctcttc 354

355 ttgactaattattttctgctgagttaaaaataataataatattgaagcatta 405

406 tttaataatgttctcgtttgaataaaatatgatcgaaagataaaaaaaaaa 456

457 gaaaaaaaaa 465

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/ES 99/00378A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/815 C12N15/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI EPO-Internal MEDLIN EMBASE CA BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	POHLIG G ET AL: "Purification, characterization and biological evaluation of recombinant leech-derived tryptase inhibitor (rLDTI) expressed at high level in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " EUR. J. BIOCHEM., vol. 241, 1996, pages 619-626, XP002900954 the whole document	1-13
A	--- BASKOVA I P ET AL: "Inhibition of plasma Kallikrein, Kininase and Kinin-like activities from the medical leeches" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 67, 1992, pages 721-730, XP002900955 the whole document --- -/--	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2000

Date of mailing of the international search report

12.05.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jose Luis Vizan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. App. 'ion No
PCT/ES 99/00378

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 587 360 A (SAWYER ROY T) 24 December 1996 (1996-12-24) the whole document ---	1-13
A	WO 95 01375 A (HEMBERGER JUERGEN ;MERCK PATENT GMBH (DE); MELZER GUIDO (DE)) 12 January 1995 (1995-01-12) the whole document ---	1-13
A	US 5 783 421 A (LEVANON AVIGDOR ET AL) 21 July 1998 (1998-07-21) the whole document ---	1-13
P,X	REVERTER D ET AL: "A Carboxypeptidase Inhibitor from the Medical Leech Hirudo medicinalis" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 49, 1998, pages 32927-32933, XP002900956 the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

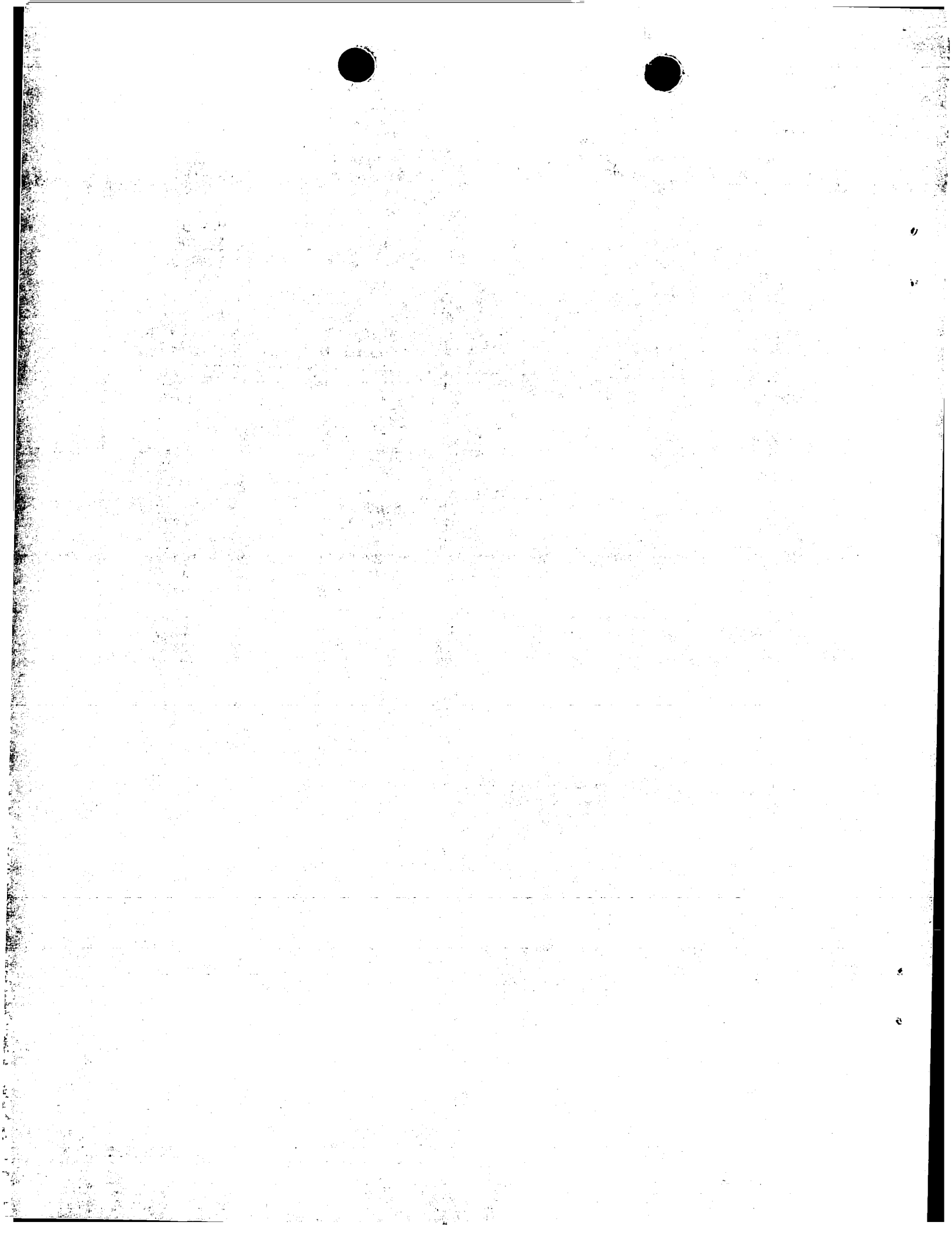
International Application No

PCT/ES 99/00378

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5587360 A	24-12-1996	AT 154034 T	15-06-1997
		AU 659807 B	01-06-1995
		AU 8666691 A	20-05-1992
		CA 2093819 A	11-04-1992
		DE 69126437 D	10-07-1997
		DE 69126437 T	04-12-1997
		DK 552269 T	03-11-1997
		EP 0552269 A	28-07-1993
		ES 2103831 T	01-10-1997
		WO 9207005 A	30-04-1992
		GR 3024437 T	28-11-1997
		JP 6505703 T	30-06-1994

WO 9501375 A	12-01-1995	AU 680929 B	14-08-1997
		AU 7383694 A	24-01-1995
		CA 2143416 A	12-01-1995
		CN 1111058 A	01-11-1995
		CZ 9500528 A	13-09-1995
		EP 0662088 A	12-07-1995
		HU 71399 A, B	28-11-1995
		JP 8500848 T	30-01-1996
		NO 950732 A	27-02-1995
		PL 307726 A	12-06-1995
		SK 27095 A	09-08-1995
		US 5710131 A	20-01-1998
		ZA 9404738 A	15-02-1995

US 5783421 A	21-07-1998	US 5824641 A	20-10-1998
		US 5863534 A	26-01-1999
		US 5858970 A	12-01-1999
		AU 682361 B	02-10-1997
		AU 6629194 A	08-11-1994
		EP 0696198 A	14-02-1996
		JP 8511157 T	26-11-1996
		NZ 265507 A	24-09-1998
		WO 9423735 A	27-10-1994



INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

olicitud internacional N°
PCT/ES 99/00378

A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN
CIP 7 C07K14/815 C12N15/15

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP 7 C07K C12N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones pertinentes
A	POHLIG G ET AL: "Purification, characterization and biological evaluation of recombinant leech-derived tryptase inhibitor (rLDTI) expressed at high level in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " EUR. J. BIOCHEM., vol. 241, 1996, páginas 619-626, XP002900954 el documento completo ---	1-13
A	BASKOVA I P ET AL: "Inhibition of plasma Kallikrein, Kininase and Kinin-like activities from the medical leeches" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 67, 1992, páginas 721-730, XP002900955 el documento completo ---	1-13
-/-		

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- *A* documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- *E* documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- *L* documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- *O* documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- *P* documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- *T* documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- *X* documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- *Y* documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- *Z* documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

7 Abril 2000

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

12.05.00

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Jose Luis Vizán

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/ES 99/00378

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	US 5 587 360 A (SAWYER ROY T) 24 Diciembre 1996 (1996-12-24) el documento completo ---	1-13
A	WO 95 01375 A (HEMBERGER JUERGEN ;MERCK PATENT GMBH (DE); MELZER GUIDO (DE)) 12 Enero 1995 (1995-01-12) el documento completo ---	1-13
A	US 5 783 421 A (LEVANON AVIGDOR ET AL) 21 Julio 1998 (1998-07-21) el documento completo ---	1-13
P,X	REVERTER D ET AL: "A Carboxypeptidase Inhibitor from the Medical Leech Hirudo medicinalis" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, num. 49, 1998, páginas 32927-32933, XP002900956 el documento completo -----	1-13

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/ES 99/00378

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5587360 A	24-12-1996	AT 154034 T	15-06-1997
		AU 659807 B	01-06-1995
		AU 8666691 A	20-05-1992
		CA 2093819 A	11-04-1992
		DE 69126437 D	10-07-1997
		DE 69126437 T	04-12-1997
		DK 552269 T	03-11-1997
		EP 0552269 A	28-07-1993
		ES 2103831 T	01-10-1997
		WO 9207005 A	30-04-1992
		GR 3024437 T	28-11-1997
		JP 6505703 T	30-06-1994
WO 9501375 A	12-01-1995	AU 680929 B	14-08-1997
		AU 7383694 A	24-01-1995
		CA 2143416 A	12-01-1995
		CN 1111058 A	01-11-1995
		CZ 9500528 A	13-09-1995
		EP 0662088 A	12-07-1995
		HU 71399 A,B	28-11-1995
		JP 8500848 T	30-01-1996
		NO 950732 A	27-02-1995
		PL 307726 A	12-06-1995
		SK 27095 A	09-08-1995
		US 5710131 A	20-01-1998
		ZA 9404738 A	15-02-1995
US 5783421 A	21-07-1998	US 5824641 A	20-10-1998
		US 5863534 A	26-01-1999
		US 5858970 A	12-01-1999
		AU 682361 B	02-10-1997
		AU 6629194 A	08-11-1994
		EP 0696198 A	14-02-1996
		JP 8511157 T	26-11-1996
		NZ 265507 A	24-09-1998
		WO 9423735 A	27-10-1994

THIS PAGE BLANK (USPTO)